人钙调素(CAM)ELISA 试剂盒使用说明书

产品编号：E0640h

EIAab

www.eiaab.cn

本试剂盒仅供体外研究使用、不用于临床诊断!

预期应用

ELISA 法定量测定人血清，血浆或其它相关液体中钙调素(CAM)含量。

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中 CAM 水平。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入 CAM 抗原、生物素化的抗人 CAM 抗体、HRP 标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 CAM 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板：一块（96 孔）

   标准品（冻干品）：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 100 ng/ml，做系列倍比稀释后，分别稀释成 100 ng/ml，50 ng/ml ，25 ng/ml，12.5 ng/ml，6.25 ng/ml，3.1 ng/ml，1.56 ng/ml，样品稀释液直接作为标准浓度 0 ng/ml，临用前 15 分钟内配制。

   如配制 50 ng/ml 标准品：取 0.5ml 100 ng/ml 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。
2. **样品稀释液**：1×20ml/瓶。
3. **检测稀释液 A**：1×10ml/瓶。
4. **检测稀释液 B**：1×10ml/瓶。
5. **检测溶液 A**：1×120ul/瓶（1：100）临用前以**检测稀释液 A** 1：100 稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 1ul 检测溶液 A 加 99ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。
6. **检测溶液 B**：1×120ul/瓶（1：100）临用前以**检测稀释液 B**1：100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。
7. **底物**溶液：1×10ml/瓶。
8. 浓**洗涤液**：1×30ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。
9. **终止液**：1×10ml/瓶（2N H_2SO4）。

标本的采集及保存

1．血清：标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。

2．血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2 - 8° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。

操作步骤

实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100ul，余孔分别加**标准品**或待测样品 100ul，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37℃反应 120 分钟。
   为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。
2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加**检测溶液 A 工作液** 100ul（取 1ul 检测溶液 A 加 99ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制），37℃,60 分钟。
3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干。
4. 每孔加**检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液）** 100ul，37℃，60 分钟。
5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干。
6. 依序每孔加**底物溶液** 90ul，37℃**避光显色**（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。
7. 依序每孔加**终止溶液** 50ul，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。
8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。 在加终止液后 15 分钟以内进行检测。

注：

1. 每次实验留一孔作为空白调零孔，该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2NH2SO4。测量时先用此孔调 OD 值至零。
2. 为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜。
3. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃保存。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配置使用。请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。
4. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可检测天然的人 CAM，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项

1. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。
2. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
3. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。

4． 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。
5．在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。
6．底物请避光保存。

检测范围：

1.56 ng/ml -100 ng/ml

说明

1．试剂盒保存：-20℃（较长时间不用时）；2-8℃（频繁使用时）。
2．有效期：6 个月
3．浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。
4．刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。
5．中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。